

Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de cepas do fungo *Cunninghamella* sp. de solo do Sul do Tocantins, Brasil

Marcus Vinicius Ribeiro Fernandes de Andrade¹, Tullio Teixeira Deusdará², Gessiel Newton Scheidt³, Aloísio Freitas Chagas Júnior⁴

1. Biomédico, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Pós-graduação em Citologia Clínica, Conselho Federal de Farmácia, Brasil. E-mail: marcusdeandrade@yahoo.com.br

2. Biomédico, Centro Universitário Luterano de Palmas. Especialista em Análises Clínicas, Faculdades Integradas de Jacarepaguá. Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins. Técnico de Laboratório, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: tullio_7@hotmail.com

3. Biólogo, Universidade Católica Dom Bosco. Mestre em Desenvolvimento Local, Universidade Católica Dom Bosco. Doutor em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná. Professor, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: gessielscheidt@yahoo.com.br

4. Agrônomo, Universidade Federal Rural da Amazônia. Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Doutor em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas. Professor Adjunto, Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: chagasjraf@mail.uft.edu.br

RESUMO: O solo é considerado um dos principais habitats para população e microorganismos com potencial biotecnológico e dentre estes, encontram-se os fungos da classe Zygomycetes, com destaque para os da ordem Mucolares do gênero *Cunninghamella*. Este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar cepas do fungo do gênero *Cunninghamella* em solo no sul do estado do Tocantins, Brasil. Para isso amostras de solo foram coletadas de área da Fazenda Experimental campus Gurupi-TO, estas foram coletadas em três pontos aleatórios em triplicata a uma profundidade máxima de 10cm e com 300g cada amostra. As características do perfil metabólico de crescimento dos fungos foram realizados em meio YPD medindo a glicose, nitrogênio e pH no intervalo de 96 horas. Foram possíveis isolar três do gênero *Cunninghamella*, identificadas como 1B, 2A e 3A. As características macroscópicas observadas foram comuns aos três isolados. Na microscopia foram observados esporangióforos eretos, ramificados e na extremidade de cada ramificação notou-se a presença de vesículas globosas com diversos esporângios. A concentração de glicose no meio líquido demonstra uma curva decrescente desde o início do cultivo até 96 horas o que caracteriza um constante consumo de glicose pelos fungos. O consumo de nitrogênio verifica-se um decréscimo na quantidade de nitrogênio nas primeiras 12 horas e entre 36 e 60 horas caracterizando o consumo dos substratos pelo microorganismo. É possível concluir que as cepas 3A e 1B, de acordo o índice de velocidade de crescimento micelial podem apresentar melhor produção de biomassa e rendimento na extração de quitina e quitosana.

Palavras-chave: *Cunninghamella* sp, fungo, solo, isolamento, quitosana.

Isolation, phenotypic characterization and growth of strains of the fungus *Cunninghamella* sp. Solo South profile of Tocantins, Brazil

ABSTRACT: The soil is considered one of the main habitats for population and microorganisms with biotechnological potential and among these, are the fungi Zygomycetes class, especially those of Mucolares order of *Cunninghamella* genre. This study aimed to isolate and characterize *Cunninghamella* genre fungal strains in soil in the southern state of Tocantins, Brazil. For this soil samples were collected from the area of the Experimental Farm campus Gurupi-TO, these were collected in three random points in triplicate to a maximum depth of 10 cm and 300g each sample. The characteristics of the metabolic profile of fungal growth in YPD medium were performed by measuring the glucose nitrogen and pH in the range of 96 hours. Were possible to isolate three *Cunninghamella* gender, labeled 1B, 2A and 3A. The macroscopic characteristics observed were common to the three strains. Microscopically sporangia were observed erect, branched and at the end of each branch was noted the presence of vesicles globose sporangia different. The glucose concentration in the liquid medium shows a downward curve from the start of cultivation to 96 hours which characterizes a constant consumption of glucose by the fungi. Nitrogen consumption is found a decrease in the amount of nitrogen in the first 12 hours and between 36 and 60 hours featuring substrate consumption by microorganisms. It was concluded that the strains 3A and 1B, according mycelial growth rate index may have better biomass production and yield in the extraction of chitin and chitosan.

Keywords: *Cunninghamella* sp, fungus, soil, isolation, chitosan.

1. Introdução

A microbiota do solo possui uma grande importância para os processos vitais do ecossistema edáfico (CHILDS, 2007), pois é responsável pela decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, fixação de nitrogênio atmosférico, fluxo de energia, solubilização de uma série de compostos essenciais, como o fósforo, decomposição de xenobióticos e, também, controle biológico de pragas e doenças de plantas (SPOSITO; ZABEL, 2003).

Assim, o solo deve ser considerado um componente crítico na biosfera terrestre, funcionando não somente no sistema de produção agrícola, mas também na manutenção da qualidade ambiental com efeito local e

regional (PRADE et al., 2006). Isso porque a biomassa microbiana é considerada a parte viva da matéria orgânica do solo e a manutenção da sua capacidade metabólica é considerada como um processo fundamental para a preservação da capacidade produtiva do mesmo (GAMA-RODRIGUES, 1999).

No contexto da biotecnologia, a biogeografia microbiana pode representar um componente imprescindível no processo de busca e descoberta de novos microorganismos com potencial para aplicação industrial (CANHOS; MANFIO, 2001). A diversidade microbiana, assim como suas propriedades biológicas (biomassa microbiana e atividade enzimática), tem sido bastante discutida como indicadora da

qualidade dos solos, principalmente com o surgimento e aprimoramento de técnicas de biologia molecular, porém pouca pesquisa tem sido feita para relacionar a diversidade microbiana, dinâmica dos solos e potencial biotecnológico (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Os fungos da classe Zygomycetes possuem considerável habilidade de adaptação a diferentes condições ambientais, resultado de variações em suas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas, representando um elemento fundamental na compreensão de seu comportamento celular, com vistas à identificação de mecanismos específicos de desenvolvimento, maturação, diferenciação e sobrevivência (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001). E por isso são considerados organismos com grande potencial econômico, industrial e na medicina (LIMA, 2003).

Entre os fungos dessa classe encontram-se os do gênero *Cunninghamella* que pertencem à ordem Mucorales e foram primeiramente descritos em 1903 como fungos filamentosos (FRANCO, 2005b). Os principais representantes são *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata* e *Cunninghamella bertholletiae* (única cepa potencialmente patogênica) (ALEXOPOULOS; MIMS, 1996).

O *Cunninghamella elegans* é o principal representante dos Zygomycetes, possuindo caráter ubíquo por sua ampla distribuição mundial e tem sido cotado por muitos autores, como hábeis em realizar vários processos biotecnológicos, possuindo aplicações em diferentes áreas da biologia celular, genética, fisiologia, farmacologia e bioquímica (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001).

No que atende ao interesse dessa linha de pesquisa, o mérito do fungo *C. elegans* Lendner 1905 deve-se à sua importância como fonte alternativa para produção de quitina e quitosana, apresentando rendimentos iguais ou superiores aos obtidos com a utilização de fontes tradicionais, como as carapaças crustáceas. Dessa forma, considerando-se o limitado conhecimento da diversidade de fungos do gênero *Cunninghamella* como o elevado potencial biotecnológico no que se refere à produção de biofilmes de quitosana, para tratamentos de feridas crônicas. Objetivou-se neste trabalho isolar cepas de fungos *Cunninghamella* sp. de solo da região sul do Tocantins para a ampliação do conhecimento da existência e diversidade de fungos do gênero *Cunninghamella* em solos, tendo em vista a carência de informação sobre a distribuição desses organismos no solo e a caracterização do perfil de crescimento, acompanhando o consumo de glicose e nitrogênio na produção da biomassa fungica.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi-TO.

Aquisição e Manutenção da Cepa Referência

A cepa referência de *Cunninghamella elegans* foi adquirida em repique ativo da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambientes e Indústria (CBMAI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP):

CBMAI 0843, mantida em placa de Petri com meio BDA, incubadas invertidas a 28°C, por 96 horas. Para manutenção da cultura, procedeu-se armazenamento de placas refrigeradas (4°C) e congelamento em glicerol 10%, mantidas em ultrafreezer a -80°C.

Área de Estudo e Coleta e Armazenamento do Solo

As coletas do solo foram realizadas na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Tocantins (UFT) campus Gurupi (latitude 11°43'45" sul e longitude 49°04'07" oeste) com altitude de 287m. A amostra de solo foi coletada em três pontos distintos e denominados Amostra 1, Amostra 2 e Amostra 3 nas margens da Represa Bananal (S 11°46'34.5", W 49°02'42.4"), em triplicata tanto na superfície como a uma profundidade máxima de 10 cm, com aproximadamente 300 g cada amostra. O solo foi recolhido com o auxílio de uma pá de jardinagem, armazenado em sacos plásticos devidamente identificados (denominação, local e data) e imediatamente transportado para o Laboratório de Microbiologia da UFT onde foi manipulado e armazenado sob refrigeração (4 °C). As três amostras de cada área foram colocadas em recipientes para homogeneização criteriosa e retirada a alíquotas final 200g cada amostra, denominadas: 1A, 1B, 1C; 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C.

Isolamento, Purificação e Manutenção dos Microrganismos

Para o isolamento do fungo foi utilizado o método de espalhamento de solo, descrito inicialmente por Duddington (1951) e modificado por Santos, Ferraz e Muchovej (1991), na qual se espalhou 2 g de solo no centro da placa de Petri com meio de cultura Agar Sabouraud (40 g L⁻¹ de Dextrose, 10 g L⁻¹ de Peptona, 20 g L⁻¹ Agar, pH 5,6) acrescido de cloranfenicol (100 mg L⁻¹), à temperatura de 28 °C, em estufa incubadora do tipo BOD (biochemical oxygen demand).

As placas foram observadas a cada 24 horas desde o primeiro dia de incubação. Quando constatada a presença de micélios ou hifas era realizada a transferência da subcultura para uma nova placa com meio de cultura Agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (100 mg L⁻¹), identificando por numeração ordinal as passagens (1ª passagem, 2ª, 3ª...), até a obtenção de cultura pura.

Depois de certificado (pelas características macroscópicas) que apenas um fungo estava contido na placa, as culturas puras foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (140 g L⁻¹ de Batata inglesa, 20 g L⁻¹ de Dextrose, 16 g L⁻¹ de Agar), para incubação invertida a 28 °C, por 96 horas e posterior identificação microscópica, armazenamento sob refrigeração (4 °C) e formação de banco de cultura a -80 °C.

A cepa recebida em repique ativo (Padrão comercial) foi então transferida e mantida em placa de Petri com meio BDA, incubadas invertidas a 28 °C, por 96 horas. Para manutenção da cultura, procedeu-se armazenamento de placas refrigeradas (4 °C) e congelamento em glicerol 10%, mantidas em ultra-freezer a -80 °C.

Identificação Microscópica dos Microrganismos

Para cada placa de Petri, com culturas puras, foram preparadas lâminas, identificando as espécies em microscópio óptico no aumento 400x.

Para identificação microscópica dos fungos foi utilizado principalmente os aspectos de microestruturas, como estruturas reprodutivas e esporos, e comparando-se com as descrições bibliográficas de Domsch et al. (1993) e Barnett e Hunter (1999). Procedendo-se então a classificação em nível de gênero da cepa isolada.

Quando necessário, proceder-se o microcultivo em lâmina, de acordo técnica descrita por Harris (1986).

Caracterização Macroscópica dos Microrganismos

Os fungos isolados foram também identificados pela observação das características macroscópicas: coloração (verso e anverso), aspecto/textura e topografia de crescimento.

Foi feito o acompanhamento de cada placa contendo cultura pura e também da cepa referência, realizando anotações a cada 12 horas. Ao comparar os fungos isolados com a cepa referência objetivou-se estabelecer semelhanças entre estes.

Os fungos foram cultivados em placa de Petri, de diâmetro de 9 cm, contendo 20 mL de meio de cultura BDA solidificado, a 28 °C e mantidos em BOD, no período máximo de crescimento de 96 horas.

Determinação da Velocidade de Crescimento Micelial

Para avaliar a velocidade de crescimento micelial, amostras dos fungos isolados e da cepa referência no formato de discos de 4 mm de diâmetro foram retiradas a partir das culturas monospóricas ativas em placas de Petri em meio BDA e repicadas no centro de novas placas (de 9 cm de diâmetro) contendo 20 mL de meio de cultura BDA solidificado, acondicionadas em BOD a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas, no período máximo de crescimento de 96 horas ou até que cobrissem completamente todo o diâmetro da placa.

A cada doze horas, com o uso de paquímetro digital, procedeu-se a medida do diâmetro do crescimento radial, tendo como base o verso da placa. Para maior precisão das medidas, com um marcador permanente, foram realizados círculos concêntricos a partir do centro até a borda das placas, acompanhando o crescimento das culturas. Para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foram utilizadas as medidas de crescimento em milímetros até que uma das amostras tivesse preenchido completamente o diâmetro da placa, procedendo-se então conforme a fórmula descrita por Oliveira (1992).

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}$$

Sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação.

A velocidade de crescimento foi classificada como rápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias).

Condições de cultivo

O cultivo em meio líquido YPD (Dextrose 20 g L⁻¹, Peptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹, pH 4,5) partiu de uma cultura monospórica de cada amostra de fungo, realizando a padronização de inóculo através da contagem de esporos em hemocitômetro na concentração final 10⁶ esporos mL⁻¹ (FELIX et al, 2009).

Consumo de glicose

O método enzimático utilizado para avaliar o consumo de glicose foi o método enzimático colorimétrico (Labtest®) sendo realizada uma curva padrão de glicose (0,5 – 5,0 g mL⁻¹), foram efetuadas leituras da absorbância em espectrofotômetro digital, a 405 nm.

Consumo de nitrogênio

O consumo de nitrogênio foi determinado também por método enzimático colorimétrico (Labtest®), foram efetuadas leituras da absorbância em espectrofotômetro digital, a 545 nm.

Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através de potenciometria utilizando-se phmetro digital (modelo portátil de bolso com eletrodo direto, Q400BD, Quimis).

3. Resultados e Discussão

Das amostras coletadas de solo foram isoladas três culturas monospóricas puras depois de quatro repiques para novas placas, que foram inicialmente identificadas com base nas características macroscópicas do gênero *Cunninghamella* e denominadas como: 1B, 2A, e 3A, de acordo os pontos de onde o solo foi coletado.

Vijaykumar e Narasimhain (1996) encontraram correlação positiva entre a população de fungos e a umidade do solo, quantidade de carbono orgânico e de fósforo disponível. Raymundo Jr. e Tauk-Tornisielo (1997), em estudo sobre os fungos filamentosos do cerrado, destacaram a relação entre profundidade, umidade, matéria orgânica, pH do solo e fatores climáticos na quantidade de microrganismos. Eles afirmaram que os fungos filamentosos são mais abundantes na profundidade de 0 a 5 cm, demonstrando a importância da camada superficial para os fungos filamentosos, área que é mais rica em matéria orgânica.

Macroscopicamente, ao final do tempo de crescimento (96 horas), observou-se para todos os isolados e para a cepa referência o aspecto algodinoso (cotonoso), com hifas altas e entrelaçadas de coloração branca, características de todas as espécies do gênero *Cunninghamella* (ALEXOPOULOS; MIMS, 1996), como pode ser visualizado nas imagens (Figura 1).

É válido ressaltar que, apesar do aspecto final, nas

primeiras 36 horas de crescimento, as amostras apresentaram uma textura aveludada de crescimento, com hifas ainda baixas e compactada ao meio de cultura. Na análise de 48 horas, foi comum para todos isolados e cepa referência um aspecto felpudo, iniciando a apresentação de hifas altas em textura de algodão que comporiam a aparência final.

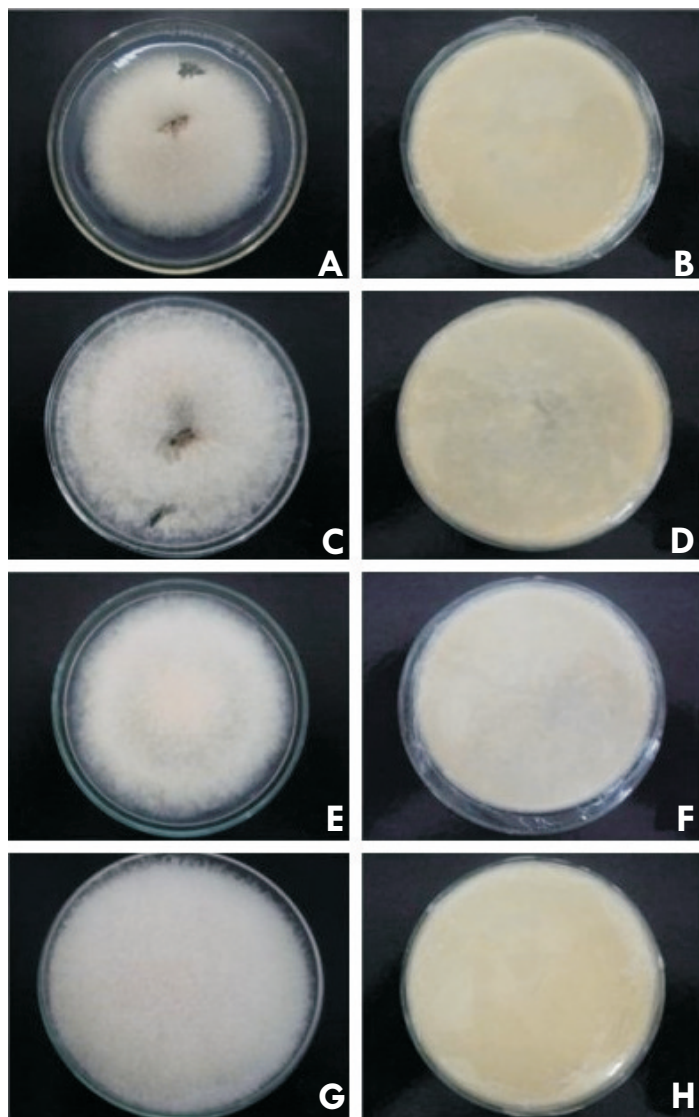


Figura 1. Aspecto macroscópico ao final de 96 horas de crescimento em placa de Petri com meio BDA. A e B, cepa Referência; C e D, Isolado 1B; E e F, Isolado 2A; G e H, Isolado 3A. À esquerda anverso da placa de cada cepa e à direita verso da placa de cada cepa. Observar aspecto algodinoso (hifas altas, entrelaçadas e brancas) em todas as cepas quando observadas por cima, e coloração bege característica do fundo da placa.

Para a identificação procedeu-se com a microscopia e identificação das microestruturas do micélio vegetativo, micélio aéreo, mas principalmente do micélio reprodutivo: hifas asseptadas (cenocíticas), esporangióforos eretos e ramificados, vesículas globosas (esporângio) com esporângios (esporos).

Os resultados da microscopia dos isolados permitiu identificar que o fungo nas amostras monospóricas tratava-se do gênero *Cunninghamella* sp., conforme características das microestruturas apresentadas depois de comparadas com a cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843) e literatura clássica.

As cepas de *Cunninghamella* sp. isoladas nesse trabalho são referidas como comumente encontradas no solo e em outros substratos orgânicos, como esterco (MORAES-FILHO,

2005; FRANCO, 2005b), contudo, no Brasil ainda existem poucos relatos sobre os fungos isolados de solo em regiões do cerrado.

Na microscopia foram observados esporangióforos eretos, simples ou ramificados e na extremidade de cada ramificação notou-se a presença de vesículas globosas onde estão inseridos os esporangiosporos. O micélio apresentou-se não septado na maioria das vezes o que caracteriza cultura jovem, como destacaram Domsch et al. (1993) em seus estudos (Figuras 2 a 5).

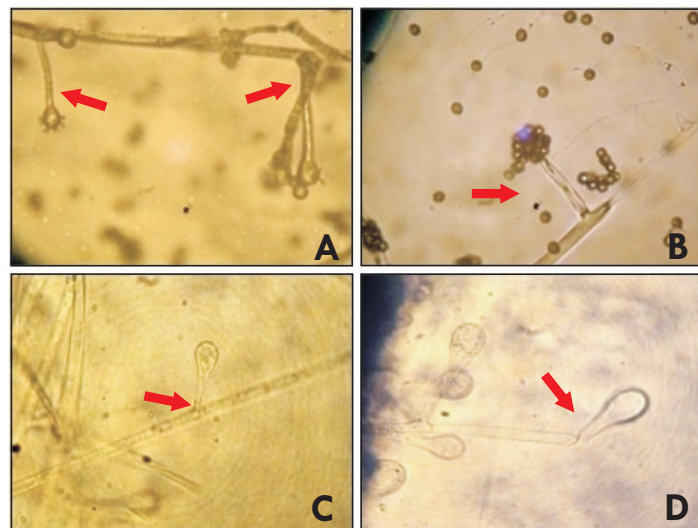


Figura 2. Microscopia da cepa referência de *Cunninghamella elegans* (CBMAI 0843). Em A, destaque para as hifas ramificadas. B mostra esporangióforo terminando em vesícula globosa ainda com esporos aderidos, diferentemente de C e D.

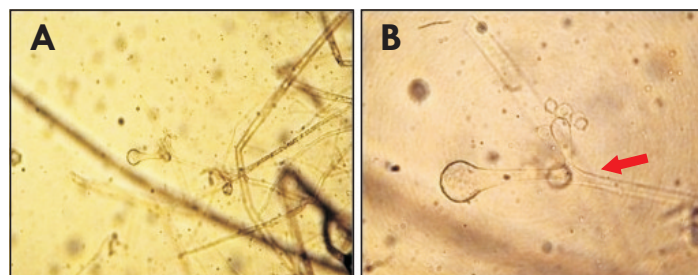


Figura 3. Microscopia da cepa 2A de *Cunninghamella* sp isolados de solo do Sul do Tocantins. B é imagem em aumento digital de A para destacar ramificação em esporangióforo e soltura de esporos.

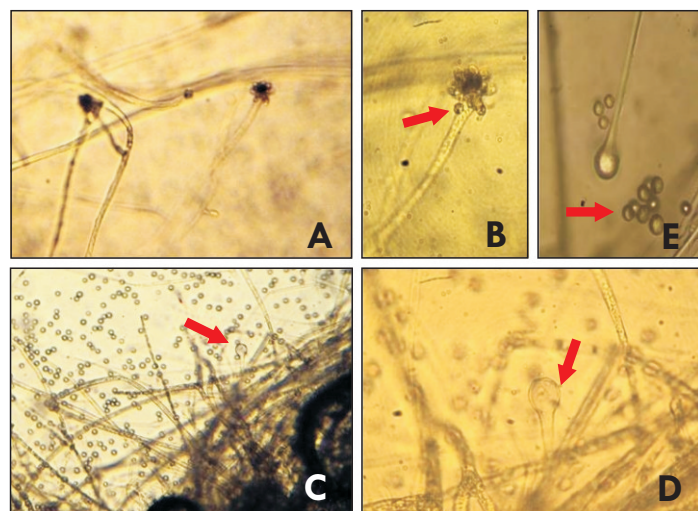


Figura 4. Microscopia da cepa 1B de *Cunninghamella* sp isolado de solo do Sul do Tocantins. Na imagem B (aumento de A) apresenta-se estrutura reprodutiva, com esporângio desorganizado e soltura de esporos. D aumento digital de C para mostrar vesícula globosa terminal de esporangióforo sem os esporos aderidos. Em E destaque para esporos livres.

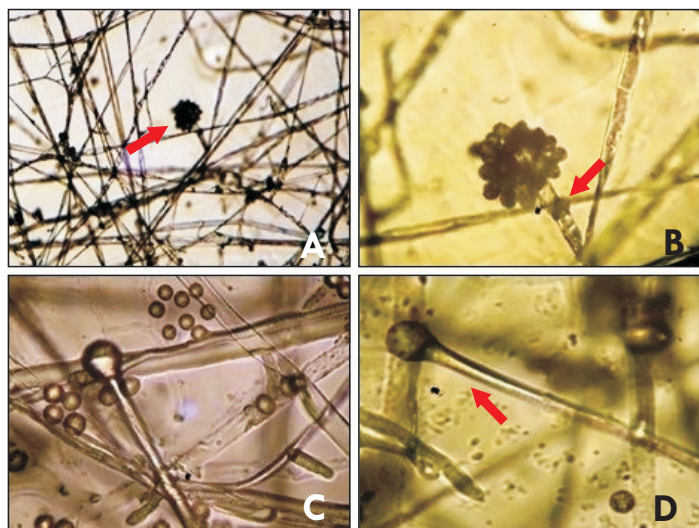


Figura 5. Microscopia da cepa 3A de *Cunninghamella* sp isolada de solo do Sul do Tocantins. B (aumento digital de A) destaca esporangióforo característico do gênero. Em C e D observar esporos arredondados soltos e hifa não septada, característica de cultura jovem.

O crescimento micelial dos fungos do gênero *Cunninghamella* aumentou linearmente com o tempo, no período de observação de 96 horas, obtendo uma velocidade de crescimento classificada como rápida (< 7 dias) (Figura 6). A cepa que apresentou maior velocidade de crescimento foi a 3A, seguida por 1B, 2A e por último a cepa referência de *C. elegans*. Uma explicação para esse ocorrido deve-se à melhor adaptação dos isolados às altas temperaturas observadas para o Estado do Tocantins, já que a cepa referência de *Cunninghamella elegans* possui a temperatura de 28 °C como ponto máximo de crescimento. Segundo Rotem (1978) temperaturas extremas ou limitrofes são responsáveis por aumentar o período latente e de incubação, alterando o perfil de crescimento do fungo. Schloter, Dilly e Munch (2003), reportaram que a atividade microbiana é regulada pelas condições nutricionais, temperatura, disponibilidade de água e outros fatores como concentração de prótons e suprimento de oxigênio. Assim, as cepas isoladas, mais adaptadas ao clima quente, produziram mais esporos, em até 48 horas de incubação, fator responsável por maior velocidade de crescimento micelial, como explicam Slade et al. (1987).

A Tabela 1 mostra o crescimento em milímetros nas leituras a cada 12 horas e a Figura 7 a cada 24 horas. É importante observar que na leitura de 84 horas a cepa isolada 3A já havia preenchido toda a placa (crescimento final de 92 mm), o que também foi atingido pelo isolado 1B, ao final de 96 horas de análise. O isolado 2A e a cepa referência não preencheram toda a placa de Petri.

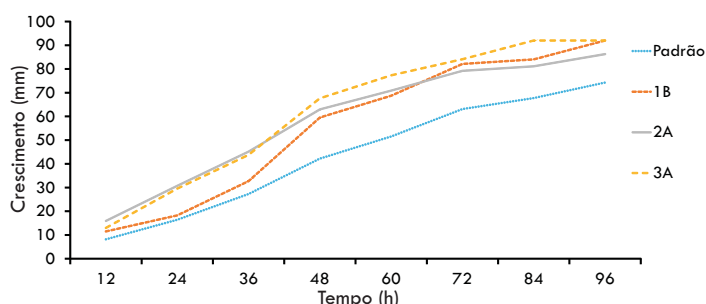


Figura 6. Curvas da velocidade de crescimento em meio BDA das cepas isoladas e da cepa referência.

O Índice de Velocidade de Crescimento Micelial foi calculado sobre os diâmetros encontrados nas leituras de 12 a 84 horas, quando o isolado 3A atingiu crescimento máximo: diâmetro total da placa de Petri (92 mm). Os cálculos de IVCM demonstraram que o isolado 3A possui a melhor taxa de crescimento: 26,28 mm/dia, enquanto que a cepa referência apresentou um resultado: 19,35 mm/dia.

Tabela 1. Distribuição da velocidade de crescimento micelial das cepas isoladas e da cepa referência no período de 96 horas em placas de Petri com meio BDA.

Cepa	Crescimento em milímetros							
	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas	84 horas	96 horas
Padrão	8,16	16,39	27,25	42,21	51,51	63,11	67,74	74,29
1B	11,50	18,24	32,69	59,53	68,71	82,14	84,05	92,00
2A	15,92	30,70	45,16	62,95	70,86	79,22	81,14	86,25
3A	12,97	29,52	43,75	67,61	77,32	84,11	92,00	92,00

Os isolados apresentaram uma relação linear entre o crescimento da colônia e o tempo nos 04 dias de avaliação. Outros estudos (DIAS, 2002) já haviam relatado que diferentes isolados poderiam apresentar diferenças significativas na velocidade de crescimento micelial em meio de cultura.

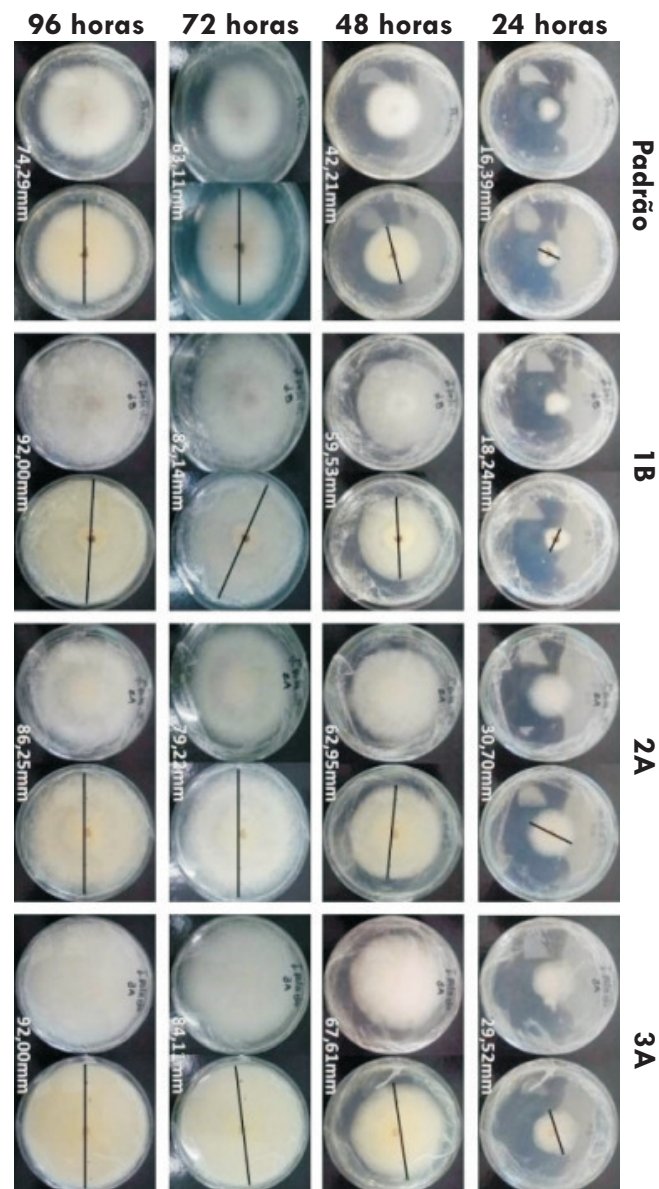


Figura 7. Caracterização da velocidade de crescimento das cepas isoladas e da cepa referência nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas.

As amostras dos fungos isolados (1B, 2A, 3A) depois de identificadas a nível de gênero como sendo do gênero *Cunninghamella*, foram encaminhadas para a Micoteca URM da UFPE, para que fossem identificadas a nível de espécie. A equipe da Micoteca reportou que as três amostras enviadas se tratavam de fungos da espécie *Cunninghamella elegans* Lendner 1905. Assim, foram legitimados os resultados da caracterização microscópica e macroscópica realizadas no Laboratório de Microbiologia da UFT.

O período de maior consumo de glicose ocorreu nas 12 primeiras horas, sendo consumidos 15,678 mg pelo Isolado 3A, 14.704 pela cepa CBMAI 0843, 12,191 mg pelo Isolado 2A e por fim 11,329 mg pelo Isolado 1B de 20,000 mg para cada cultura, estabelecendo um consumo médio de glicose para o primeiro período de estudo de 13,475,5 mg (Figura 8). No final do processo fermentativo constatou-se a presença em média para todas as cepas de 1,1375 mg dL⁻¹ de glicose remanescente, ou seja 11,375 mg de glicose que não foi considerada como excesso de fonte de carbono para o crescimento dos fungos, como observou Franco et al. (2004) quando cultivou *C. elegans* em meio líquido que possui 60 g de glicose em sua composição, ou seja, três vezes que no meio YPD utilizado nesse estudo, referindo, assim, um excesso de 8 g L⁻¹. Essa constatação tem ainda maior significância quando se relata que para a cepa padrão CBMAI 0845 houve apenas 3,5 mg de sobra.

Em pesquisa para isolar quitosana de outro fungo de ordem Mucolares o *Mucor rouxii*, White, Farina e Fulton (1979) ao cultivá-lo em meio YPD (1,0% de extrato de levedura, 0,3% de peptona e 4% de dextrose diluídos em 1 L de água destilada) reportam uma sobra um pouco maior que 5 g L⁻¹ em 48 horas de cultivo. Félix et al. (2009) cultivaram *Cunninghamella elegans* (IFM46109) em meio Sabouroud (glicose – 40 g; peptona – 10,0 g; água – 1 L; pH 5,63) e concentração final de inóculo de 10⁶ esporos mL⁻¹ e verificaram presença de glicose ao termino de 96 horas do cultivo caracterizando um excesso de fonte de carbono, contudo, após este período, de 96 a 120 horas, houve utilização completa desta substrato pelo microorganismo.

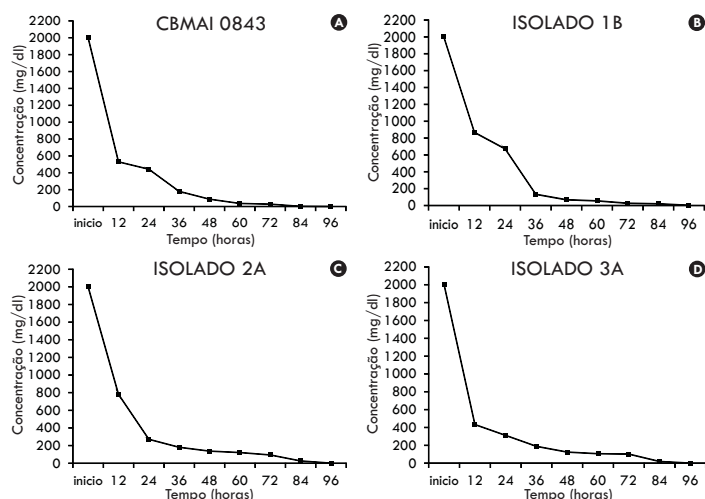


Figura 8. Gráficos da curva de consumo de glicose das cepas de fungo *Cunninghamella elegans* CBMAI 0843(A), Isolado 1B (B), Isolado 2A (C), Isolado 3A(D). Observar que para todas as cepas a curva é decrescente tendendo ao zero e possui maior declínio nas 12 primeiras horas de cultivo.

Para a curva de nitrogênio também observou-se que o maior consumo aconteceu nas doze primeiras horas, o que pode ser explicado pela fase de adaptação do fungo ao meio. Os dados referentes à concentração de nitrogênio no decorrer do período de crescimento em meio líquido (Figura 9).

O consumo médio de nitrogênio nas 12 primeiras horas foi de 7,03 g, sendo os Isolados 1B e 3A apresentaram o maior consumo, 7,34 g, seguidos pelo Isolados 2A 7,24 g e cepa CBMAI 0843 de 6,2 g. Outro período de decréscimo aconteceu entre 36 e 60 horas caracterizando o consumo deste substrato pelos fungos.

Contudo, excetuando-se o decréscimo naqueles dois períodos relatados, entre 12 e 36 horas e 60 a 96 horas de cultivo registrou-se um aumento na quantidade de proteínas totais que pode ser devido à produção de enzimas pelo fungo, tais como quitinase (no 1º momento) (STAMFORD et al., 2007), na qual foi observado uma maior produção dos polímeros que é a base estrutural do microorganismo, sendo a quitina e a quitosana nas primeiras horas do ensaio, e no segundo período devido ao metabolismo secundário no crescimento do microorganismo produzindo compostos nitrogenados, conforme relatou Amorim et al. (2001). Félix et al. (2009) verificou decréscimo inicial de nitrogênio até o período de 24 horas, e posteriormente entre 72 e 96 horas, registrando aumento deste substrato nos tempos 24 a 72 horas e posteriormente a 96 horas, notando dois tempos de acréscimo como nesta pesquisa.

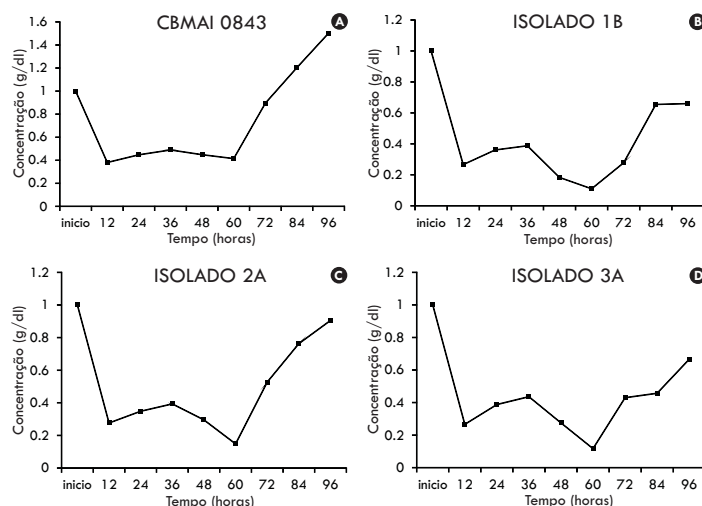


Figura 9. Gráficos da curva de consumo de nitrogênio das cepas de fungo *Cunninghamella elegans* CBMAI 0843(A), Isolado 1B (B), Isolado 2A (C), Isolado 3A (D). Observar que todas as cepas há declínio importantes nas 12 primeiras horas e crescimento na concentração de nitrogênio a partir de 60 horas.

O pH do meio oscilou durante as 96 horas de cultivo entre 4 e 7 (Tabela 2) como também relatou Carvalho (2000) em seu estudo com *Cunninghamella elegans*. Stamford et al. (2007), demonstraram uma variação entre 5 e 7. Amorim et al. (2001) descreveram que em seu cultivo em meio YPD (28 °C) aconteceu uma queda do pH nas primeiras 24 horas, permanecendo até o final das 96 horas entre 3 e 4.

Tabela 2. Variação do pH das cepas de fungo *Cunninghamella elegans* no decorrer do tempo em cultivo em caldo YPD.

Tempo (horas)	CBMAI 0843	Isolados 1B	Isolados 2A	Isolados 3A
0	4,50	4,50	4,50	4,50
12	4,19	4,24	4,27	4,24
24	5,50	5,77	5,20	5,01
36	5,73	5,87	5,85	5,98
48	4,94	5,02	5,38	5,36
60	5,08	5,03	5,53	5,52
72	5,95	5,53	5,59	5,53
84	6,35	6,64	5,94	5,66
96	6,54	6,76	6,65	6,78

Nas primeiras 12 horas de cultivo o fungo estava em fase de adaptação ao meio, realizando maior consumo de glicose. Amorim et al. (2001) relatam o que faz o pH atingir os seus valores mais baixos devido a produção de ácido pirúvico decorrentes de altas concentrações de glicose, chamada de fase exponencial. Contudo, após a fase lag em que apresenta valores aproximadamente constante (entre 5 e 6) o pH tende à fase neutralidade, atingindo os seus valores mais altos (próximo a 7) possivelmente por causa das baixas concentrações de glicose no meio ao final do tempo de cultivo. Franco et al. (2004) também relataram valores constantes de pH durante a fase "lag" e queda do pH durante a fase exponencial.

4. Conclusão

Os isolados se comportaram praticamente da mesma maneira entre si para as variáveis estudadas, contudo, com sutis diferenças para a cepa referência de *Cunninghamella elegans*, as concordâncias foram mais marcantes, a destacar: a curva de consumo de glicose do isolado 1B assemelha-se mais com a da cepa referência, enquanto a curva de consumo de nitrogênio é o isolado 2A quem tem maior correspondência com a cepa CBMAI 0843. Os fungos estudados tratavam-se da espécie *Cunninghamella elegans*, fungo que tem sido extensivamente estudado pelo seu elevado potencial microbiológico, biomédico e biotecnológico. Por isso, torna importante inferir que, as cepas 3A e 1B, de acordo o IVCm podem apresentar melhor produção de biomassa em cultivo em batelada em detrimento à cepa referência CBMAI 0843 e consequentemente melhor rendimento na extração de quitina e quitosana.

Por fim, este trabalho contribui para a ampliação do conhecimento da existência e diversidade de fungos do gênero *Cunninghamella* no solo. E por isso, há como perspectiva novos estudos, a fim de estabelecer o potencial biotecnológico daqueles, principalmente no que se refere à extração de quitosana.

5. Referências bibliográficas

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. **Introductory mycology**. Jonh Wiley & Sons, New York p. 61-63, 1996.
- AMORIM, R. V. S.; SOUZA W.; FUKUSHIMA K.; CAMPOS-TAKAKI G. M. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, n. 1, p. 20-23, 2001.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 218p.
- CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos microbiológicos para biotecnologia**. 2001.

- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. Second edition. Elsevier. Tokyo, Academic press. 2001.
- CHILDS, G. M. F. **Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistemas fechado**. 2007. 70f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias – UNESP, Jaboticabal, 2007.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. 2. ed. Echting, IHW-Verlag, v.1, 860p.1993.
- DUDDINGTON, C. L. The ecology of predacious fungi I. preliminary survey. **Transactions British Mycological Society**, v. 34 p. 322-331, 1951.
- FELIX, F. F.; BERGER, L. R. R.; SILVEIRA, A. C. G. A.; STAMFORD, N. P. Perfil de crescimento de *Cunninghamella elegans* em meio sabouraud. IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pernambuco. R0617-2. 2009.
- FRANCO, L. O. **Aspectos bioquímicos e fisiológicos do acúmulo de polifosfato inorgânicos por *Cunninghamella elegans***. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005b.
- FRANCO, L. O.; MONTENEGRO, C. T.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**. n.14, 2005a.
- FRANCO, L. O.; MAIA R. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 243-247, 2004.
- GAMA-RODRIGUES, E. F. **Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes**. Porto Alegre: Millenium, p.09-26, 1999.
- GLIESSMANN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: Ed. universidade. 2000. 653p.
- HARRIS, J. L. Modified method for fungal slide culture. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 24, n. 3, p. 460-461, 1986.
- LIMA, M. A. B. **Aspectos bioquímicos e citoquímicos do polifosfato em *Cunninghamella elegans***. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2003.
- MORAES-FILHO, M. A. **Avaliação do potencial biotecnológico de *Phanerochaete chrysosporium* UCP 963 e *Cunninghamella elegans* UCP 596 na remoção de cobre e zinco**. Tese (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, 2005.
- OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Ciência e Prática**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 1992.
- PRADE, C. A.; MATSUMURA, A. T. S.; GUERRERO, R. T.; PORTO M. L. Diversidade de fungos filamentosos de microscópio do solo em uma plantação de *Hovenia dulcis* Thumb. **Biociências**, v. 14, n. 2, p. 101-106, 2006.
- RAYMUNDO JÚNIOR, O. R.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Occurrence of Hyphomycetes and Actinomycetes in Red-yellow latosol from a cerrado region in Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo v. 28, p. 197-203, 1997.
- ROTEM, J. Climate and weather influence on epidemics. *Plant disease*. New York: Academic, p. 317-436. 1978.
- SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, v.15, p.121-134, 1991.
- SCHLOTTER, M. A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. J.; Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. v. 98, Issues 1-3, 255-262. 2003.
- SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agronômico de Campinas (SP). 2007. 312p.
- SLADE, S. J.; HARRIS, R. F.; SMITH, C. S.; ANDREWS, J. H. Microcycle conidiantion and sporecarrying capacity of *Colletotrichum gloeosporioides* on solid media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2106-2110, 1987.
- SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. **Geoderma**, v. 114, n. 3/4, p.143-144, 2003.
- STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; NETO, B. B. CAMPOS-TAKAKI, G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 1, p. 61-68. 2007.
- VIJAYKUMAR, B. S.; NARASIMHAM, A. V. L. Microbial ecology of groundnut soil in anantapur district. **Journal of Maharashtra Agricultural Universities**. v. 20, n. 3 p. 339-340,1996.
- WHITE, S. A.; FARINA, P. R.; FULTON, I. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 323-328. 1979.
- ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n.3, p. 391-411, 2003.